

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>A01N 1/02</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 96/13159</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>9. Mai 1996 (09.05.96)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/DE95/01490</b>		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 26. Oktober 1995 (26.10.95)		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(30) Prioritätsdaten: <b>P 44 38 232.4 26. Oktober 1994 (26.10.94) DE</b>			
(71)(72) Anmelder und Erfinder: FUHR, Günter [DE/DE]; Berliner Strasse 28A, D-13127 Berlin (DE). HORNUNG, Jan [DE/DE]; Zeiler Weg 36, D-13189 Berlin (DE). HAGEDORN, Rolf [DE/DE]; Wartiner Strasse 16, D-13057 Berlin (DE). MÜLLER, Torsten [DE/DE]; Hartriegelstrasse 100, D-12439 Berlin (DE). HOWITZ, Steffen [DE/DE]; Wormser Strasse 58, D-01309 Dresden (DE).			
(74) Anwalt: HERTZ, Oliver; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).			
<p>(54) Title: CRYO-PRESERVATION AND LOW-TEMPERATURE PROCESSING OF BIOLOGICAL OBJECTS</p> <p>(54) Bezeichnung: KRYOKONSERVIERUNG UND TIEFTEMPERATURBEARBEITUNG VON BIOLOGISCHEN OBJEKten</p> <p>(57) Abstract</p> <p>For the purposes of the located cryo-preservation of individual living biological objects (e.g. cells) or a predetermined assembled number thereof, said objects are emptied from a storage container on a supercooled substrate (13) in an enveloping solution in microdrop form (12), e.g. via microdropper (12). The substrate is brought to temperature via a coolant (15), with the surface to be covered in a gas atmosphere or a vacuum (14). The surface of the substrate is kept at a temperature <math>T_1</math> causing the impinging microdrops to freeze, while the substrate surface is microstructured for support and may contain measuring components. By suitably moving either the substrate or the microdropper it is possible to apply the microdrops individually and in samples in a freely selectable array or one predetermined by the substrate structure. The substrates with the applied microdrops and the cells frozen therein are stored at temperatures <math>T_2</math> of down to -273 °C and or subjected to a material-removing process with a treatment agent (17) or to a deposition treatment. It is possible in the deep-frozen state to perform manipulations like removal by mechanical action or the addition of solutions and substances to the surface of the substrate. On thawing, the substrate surface is taken to a temperature <math>T_1</math> above the freezing point of the enveloping solution and the microdrop array is thawed in a predetermined manner.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Zur lagedefinierten Kryokonservierung einzelner oder in vorgebarer Zahl zusammengestellter lebender biologischer Objekte (zum Beispiel Zellen) werden diese aus einem Vorratsgefäß, zum Beispiel über eine Mikrotropfenschübeinrichtung (11) auf ein tiefgekühltes Substrat (13) in einer Umhüllungslösung in Mikrotropfenform (12) aufgeschossen. Das Substrat wird über ein Kühlmittel (15) temperiert, wobei die zu belegende Oberfläche sich in einer Gasatmosphäre oder im Vakuum (14) befindet. Die Substratoberfläche wird auf einer Temperatur <math>T_1</math> gehalten, die das Gefrieren des austreffenden Mikrotropfens bewirkt, wobei die Substratoberfläche unterstützend mikrostrukturiert sein und Meßelemente enthalten kann. Durch gesteuerte Bewegung entweder des Substrats oder der Mikrotropfenschübeinrichtung lassen sich die Mikrotropfen in frei wählbaren oder durch die Substratstrukturierung vorgegebenen Arrays aufbringen. Die Substrate mit den aufgebrachten Mikrotropfen und den darin eingefrorenen Zellen werden bei einzeln und in Mustern bearbeitet. Die Substrate mit den aufgebrachten Mikrotropfen und den darin eingefrorenen Zellen werden bei Temperaturen <math>T_2</math> bei bis zu -273 °C gelagert und/oder materialabhebend mit einem Bearbeitungsmittel (17) oder -auflagernd bearbeitet. Im tiefgefrorenen Zustand können Manipulationen, wie Entnahme durch mechanisches Abtragen oder Zugabe von Lösungen und Substanzen auf die Oberfläche des Substrates, vorgenommen werden. Beim Auftauen wird die Substratoberfläche auf eine Temperatur <math>T_1</math> oberhalb des Gefrierpunktes der Umhüllungslösung gebracht und in vorgebarer Weise das Mikrotropfenarray aufgetaut.</p>			

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

## Beschreibung

**Kryokonservierung und Tieftemperaturbearbeitung von biologischen Objekten**

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung, um mikroskopische Objekte, insbesondere biologische Objekte, einzelne Zellen, Zellverbänden oder Zellbestandteile oder Makromoleküle in definierter Lage nach vorgebbaren Temperaturprogrammen in flächigen, ggf. 10 räumlichen Mustern, zu kryokonservieren, in tiefgefrorenem Zustand zu verändern und unter Beibehaltung der Vitalität der Zellen wieder aufzutauen.

In der Medizintechnik, bei der Anlage von Zellbanken und in der biologisch-pharmazeutischen Forschung werden seit Jahrzehnten Zellen eingefroren und nach vorgegebenen Prozeduren 15 wieder aufgetaut, ohne daß die Lebensprozesse bei zumindest einem Teil des kryokonservierten Materials irreversibel gestört werden. Zu diesem Zweck werden die Zellen zumeist in einer Lösung suspendiert und in Mikrotubes eingefroren (R. Ian Freshney: Tierische Zellkulturen, Walter de Gruyter 1990, S.221). Die Lösungen werden mit Substanzen versetzt, die die Eiskristallbildung beeinflussen (sogenannte Kryokonservierungsmitteln wie z.B. Dimethylsulfoxid, Glyzerin). Diese 20 Techniken haben sich bewährt und führen bei sachgerechter Anwendung zu Überlebensraten zwischen wenigen Prozent und nahezu 100%. Da das Zellgut bei sehr vielen traditionellen Anwendungen nach dem Auftauen zuerst in Kultur genommen und stark vermehrt wird, spielt die Überlebensrate nach der Kryokonservierung dieser Art eine untergeordnete Rolle. Das setzt allerdings voraus, daß genügend Zellen zur Verfügung stehen.

25

Bei der immer selektiver werdenden Arbeitsweise der Zellgewinnung in der Medizin, Genetik oder Molekularbiologie ist das jedoch mit steigender Tendenz nicht mehr der Fall. Als ein Beispiel sei die gezielte genetische Veränderung lebender Zellen genannt, die nur bei einzelnen Zellen zum tatsächlich gewünschten Ergebnis führt. Mit gesonderten Auswahlverfahren (Screening) werden 30 diese Zellen isoliert und stehen für weitere Anwendungen zur Verfügung. Eine derartige Anwendung stellt die Hybridomzellengewinnung dar (B. Gustafsson, Cryopreservation of Hybridomas, in "Methods in Molecular Biology, Vol.5, Eds. J.W.Pollard and J.M. Walker, 619-621), wie sie zur Produktion monoklonaler Antikörper z.B. Krebstherapie erforderlich und üblich ist, bei der in der Regel nur ganz wenige Zellen aus Zellpärchen (Lymphozyt, Myelomzelle) gebildet 35 und kryokonserviert werden müssen. Gerade bei den hier üblichen geringen Zellzahlen ist eine Kryokonservierung nur bedingt möglich (R. Ian Freshney: Tierische Zellkulturen, Walter de Gruyter 1990, S.221), da beim Umgang mit den auftretenden kleinen Lösungsmengen und der Wiedergewinnung der Zellen große Schwierigkeiten entstehen. Weiterhin ist eine individuelle

Identifizierung der Zellen bei Suspensionstechniken nicht möglich, was jedoch bei den oben genannten Verfahren gefordert ist.

Als besonders nachteilig erweist sich beim Einfrieren von Zellen in Zellsuspensionen der Gradient der Temperaturverteilung in der Lösung, da die Einfrierbedingungen für die Einzelzelle nicht bekannt bzw. sehr unterschiedlich sind, weil deren Position in der Suspension undefiniert ist und nicht konstant bleibt (M.J. Ashwood-Smith and J. Farrant, Low Temperature Preservation in Medicine and Biology, Kent, England (1980)). Die Reproduzierbarkeit der Bedingungen und damit die Standardisierung ist jedoch in zunehmendem Maße wichtig, wenn nach der Kryokonservierung mit Einzelzellen weiter gearbeitet werden soll.

Eine modifizierte Art der Kryokonservierung, speziell für adhärente Zellen, ist die Konservierung von auf Oberflächen aufgewachsenen Zellen (T. Ohno, A simple method for *in situ* freezing of anchorage-dependent cells. In: A. Doyle, J.B. Griffiths, D.G. Newell, Cell and Tissue Culture, John Wiley & Sons, S. 4C:2.1). In der Regel werden dazu auf geeigneten Substraten (behandelte Glas- oder Plastikoberflächen) dünne Zellschichten, sogenannte Zellmonolayer, aufwachsen gelassen und nachfolgend als Zellrasen eingefroren und aufgetaut. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß der Zellbewuchs zufällig erfolgt und die Einzelzelle auch hier schwer über den Kryozeitraum hinaus lokalisiert werden kann. Da bisher zum Aufwachsen sogenannte Mikrotiterplatten verwendet werden, können auch hier keine ortsdefinierten Bedingungen erreicht werden. Hinzu kommt, daß das Verfahren nur für adhäsent wachsende Zellen anwendbar ist.

Es ist bekannt, und wird zur Kryokonservierung von Zellen für die Elektronenmikroskopie (J.R. Harris, Electron Microscopy in Biology, IRL Press (1991) genutzt, daß Zellen in Mikrotropfen über Düsen in eine stark unterkühlte Atmosphäre eingesprühnt werden können ( H. Plattner, W.W. Schmitt-Fumian and L. Bachmann, Cryofixation of single cells by spray-freezing, in "E.L. Benedetti and P. Favard, Freez-etching. Techniques and Application, Soc. Franc. Microsc. Electronique, Paris 1973, 81-100) und auf diese Weise sehr schnell gefrieren (Kühlgeschwindigkeiten von bis zu 10 000 °C/s). Dieses Verfahren hat jedoch den Nachteil, daß die Zellen in einen Lagerbehälter oder eine Kryoflüssigkeit ohne definierte Lagebeziehung fallen. Eine gezielte Kombination von Zellen und deren individuelle Identifizierung ist nicht möglich.

Dabei können Mikrotropfenschußeinrichtungen benutzt werden, wie sie z.B. bei Druckern zur Erzeugung von Tintentröpfchen, aber auch zum Aufbringen von Klebern und anderen Flüssigkeiten auf Oberflächen bekannt sind. Auch das Verschießen von Zellen in Mikrotropfen ist bekannt und wird in Zellsortiergeräten angewendet (M.R. Melamed, T. Lindmo and M.L. Mendelsohn (Eds), Flow Cytometry and Sorting, J.Wiley, New York (1990), 171- 179). Die Zellen werden hierbei einzeln in Mikrotropfen verschossen, über eine Ablenkvorrichtung (z.B.

elektrische Felder) räumlich sortiert und in Sammelgefäß oder auf Zellkultivierungssubstrate aufgebracht. Auch hiermit ist keine individuelle Handhabung der Objekte möglich, weil größere Zellmengen (1000 bis 1 000 000 Zellen) in relativ große Gefäße sortiert werden.

5 Gegenüber diesem Stand der Technik liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung anzugeben, mit denen es möglich ist, mikroskopische Objekte, insbesondere biologische Objekte, einzelne Zellen, Zellverbände oder Zellbestandteile oder Makromolekülsuspensionen reproduzierbar, geordnet und lagefixiert einzufrieren, zu bearbeiten und zu einem späteren Zeitpunkt unter Beibehaltung der Vitalität wieder aufzutauen, wobei eine individuelle Identifizierung der eingefrorenen und kryokonservierten Objekte möglich sein soll.

Diese Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche 1 und 17 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen. Diese konkretisieren und erweitern den abstrakten - von Anspruch 1 und 17 in seinen tragenden Merkmalen umrissenen - Gedanken des gezielten Ablegen von biologischen Objekten in Mikrotropfen auf eine temperierte und gegebenenfalls mikrostrukturierte Substratoberfläche, die Modifizierung der Oberflächenschichten oder Zellen im Zustand eines Festkörpers, ihre Lagerung und das spätere Auftauen.

20 Das gezielte Ablegen der biologischen Objekte, die insbesondere durch Zellen gebildet werden, kann mittels Verschließen durch eine Mikrotropfenschlußeinrichtung oder durch Positionieren mittels einer Kapillare oder einer Trägerspitze erfolgen. Im letzteren Fall wird an der Spitze, zum Beispiel der Kapillare, ein Mikrotropfen mit dem biologischen Objekt angehängt oder erzeugt. Die 25 Kapillare oder Trägerspitze ist mit einem steuerbaren Geschwindigkeitsprofil in bezug auf die Substratoberfläche beweglich.

Die erfindungsgemäßen Verwendungen der Vorrichtung und des Verfahrens sind im Anspruch 24 erfaßt.

30 Durch Vereinzeln oder Gruppenbildung der sich in einer Umhüllungslösung befindlichen mikroskopischen Objekte bzw. durch Portionieren der Umhüllungslösung und damit Einschluß der Objekte oder der Makromoleküle oder Portionierung der reinen Umhüllungslösung in Mikrotropfen (Pikoliter bis wenige Mikroliter) beim Aufbringen auf eine, auf die Temperatur  $T_1$  eingestellte 35 Substratoberfläche, welche so geregelt ist, daß die Mikrotropfen beim Auftreffen auf die Substratoberfläche ortstreu anhaften und gefrieren, werden die sich in den Mikrotropfen befindlichen mikroskopischen Objekte bzw. Makromoleküle kryokonserviert. Unter biologischen Objekten sollen insbesondere einzelne Zellen, Zellverbände und Zellbestandteile verstanden

werden. Durch Wahl und gezielte Steuerung der Temperatur  $T_1$  des Substrats können zeitliche Kühlgeschwindigkeiten von wenigen  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . bis zu einigen Tausend  $^{\circ}\text{C}/\text{sek}$ . für die Abkühlung der auftreffenden Mikrotropfen erreicht werden. Durch zeitliche und räumliche Steuerung der Vereinzelung und des Aufbringens auf die Substratoberfläche können wohldefinierte

5 Lagebeziehungen der Mikrotropfen und entsprechend der darin eingeschlossenen Objekte zueinander und zum Substrat erreicht werden. Nach dem Aufbringen der Mikrotropfen lassen sich die Substrate über vorgebbare Temperaturverläufe auf eine Lagertemperatur  $T_2$  oder Bearbeitungstemperatur  $T_3$  bringen, die erfahrungsgemäß unterhalb  $-80^{\circ}\text{C}$ , häufig bei  $-196^{\circ}\text{C}$  liegen wird. Für kurzzeitige Lagerung und Behandlungen sind auch höhere Lagertemperaturen möglich, die in jedem Fall aber unterhalb des Gefrierpunktes der Umhüllungslösung liegen.

10 Unter Umhüllungslösung werden prinzipiell alle Lösungen, Lösungsgemische, Seren oder Kulturmedien verstanden. Umhüllungslösungen für biologische Objekte sollen deren Vitalität gewährleisten, wohingegen für Makromoleküle alle Lösungen und Lösungsgemische denkbar sind.

15 Auch soll, wenn von eingeschlossenen mikroskopischen Objekten die Rede ist, jedes irgendwie geartete Objekt, dessen Abmessungen kleiner als der der Mikrotropfen ist, gemeint sein, also auch insbesondere Liposome, Latexpartikel und andere Mikropartikel. Selbst Umhüllungslösungen bestehend nur aus einer oder mehreren chemischen Komponenten ohne oben genannte Objekte sollen an sich hier unter den Begriff Objekt fallen.

20 20 Die Temperierung der Substratoberfläche kann vorzugsweise mittels bekanntem Kühlelement (Peltierelement) oder durch Kontakt mit kryogenen Flüssigkeiten (z.B. flüssigem Stickstoff) erfolgen. Die Temperatur der verschossenen Umhüllungslösung soll für biologische Objekte in physiologischen Bereichen liegen.

25 Eine bevorzugte Vorrichtung zum Vereinzen und Aufbringen der biologischen Objekte sind Mikrotropfenschußeinrichtungen, die insbesondere auf dem Prinzip des piezoelektrischen Effekts beruhen, wobei durch eine zeitlich und räumlich frei wählbare Positionierung von Mikrotropfenschußeinrichtung und Substratoberfläche zueinander und eine zeitliche Steuerung 30 des Vereinzel- und Aufbringprozesses die Mikrotropfen in gewünschten Strukturen oder Positionen auf die Substratoberfläche gebracht werden können. Durch diese Mikrotropfenschußeinrichtungen werden Mikrotropfen gleicher Größe erzeugt, die wesentlich für die reproduzierbare und definierte Kryokonservierung sind.

35 35 Bei einer weiteren Ausführungsform wird das Überführen der Umhüllungslösung und damit der eingeschlossenen mikroskopischen Objekte und Makromolekülen in Aerosolen (Mikrotropfenwolke) durch bekannte Sprühverfahren bevorzugt, wobei die Aerosole auf die

gekühlte Oberfläche gesprüh werden und dort dünne und gefrorene Schichten bilden. Auch hier ist eine zeitliche und auch räumliche Steuerung des Aufbringens möglich.

Unter räumlicher und zeitlicher Strukturierung soll insbesondere eine zwei- und dreidimensionale

5 Anordnung der Mikrotropfen auf der Substratoberfläche verstanden werden, wobei die Mikrotropfen gleicher oder unterschiedlicher Umhüllungslösung sein und/oder gleiche oder unterschiedliche mikroskopische Objekte und Makromoleküle enthalten können. Durch das Gefrieren der Umhüllungslösung ist die erfindungsgemäße technische Lehre geeignet, räumliche Strukturen unterschiedlicher biologischer Objekte, Makromoleküle oder auch nur unterschiedlicher

10 Umhüllungslösungen reproduzierbar, definiert, lagefixiert und geordnet zu erzeugen. Die freie Kombinierbarkeit ermöglicht es somit, bisher nicht realisierbare Strukturen stabil zu erzeugen. Durch das Auftauen der auf die Substratoberfläche aufgebrachten Strukturen können die unterschiedlichen Komponenten der Strukturen miteinander in Wechselwirkung gebracht werden, wobei chemische Reaktionen ablaufen oder biologische Objekte untereinander oder mit der

15 veränderte Umgebung in Wechselwirkung treten können oder auch nur das Auftauen von biologischem Material unter anderen Bedingungen als beim Gefrieren erfolgen kann. Derartige Asymmetrien zwischen Einfrier- und Auftaupositionen, treten bei den bekannten Kryoverfahren zum Teil zwangsläufig auf, lassen sich aber nicht wie in dem hier beschriebenen Verfahren variieren und reproduzierbar wiederholen.

20 Das Substrat, auf das die Mikrotropfen mit den Zellen aufgebracht werden, kann aus Glas, Plastik, Metall, Halbleitern, Keramiken oder anderen temperaturgradientenbeständigen Materialien bestehen. Im einfachsten Fall handelt es sich um eine glatte, unstrukturierte Oberfläche, auf die die Tropfen in festlegbarem Abstand zueinander aufgebracht werden. Zweckmäßigerweise

25 strukturiert man die Oberfläche des Substrates jedoch, um einerseits ein Lokalisieren und Wiederfinden der Zellen zu ermöglichen, andererseits die Separierung, selektive Vermessung der Zellen, oder den Einfrier- und Auftauprozess zu unterstützen und zu ermöglichen. In diesem Zusammenhang bieten sich vor allem Substrate einer Größe von einigen Quadratmillimetern bis zu einigen Quadratzentimetern (z.B. Halbleiterwafer, Halbleiterchips) an, die mit den Methoden

30 der Halbleitertechnologie strukturiert worden sind. Insbesondere die guten Temperaturleiteigenschaften und die Möglichkeit der räumlichen Strukturierung im Mikrometer- und Submikrometerbereich favorisieren Silizium und seine Oxide sowie andere Halbleitersubstrate, aber auch Metalle und Keramiken als Basismaterial.

35 Unter Mikrostrukturierung wird hier verstanden, daß sich Aushöhlungen, Kanäle, Brücken, Durchbrüche oder Erhöhungen, einzeln oder in Mustern bzw. in sich abwechselnder Folge auf der Substratoberfläche befinden, deren Abmessungen in der Regel der Größe der Zellen oder Mikrotropfen entsprechen bzw. feiner oder größer ausgeführt werden. Typische Maße für tierische

Zellen sind 5 bis 100  $\mu\text{m}$ . Im Falle von Bakterien, Mycoplasmen, Viren oder ähnlich kleinen Partikeln handelt es sich um Strukturierungen im Mikrometer und Submikrometerbereich.

Diese Strukturen erfüllen erfahrungsgemäß die folgenden Aufgaben:

- 5 - mechanische Abgrenzung der Mikrotropfen gegeneinander (z.B. Verhinderung einer Tropfenspreitung), Erhaltung ihrer Individualität u.a. auch hinsichtlich des Auftauens in einer Flüssigkeit, die die gesamte Substratoberfläche benetzt, oder auch räumliche Fixierung zum Aufbringen weiterer Mikrotropfen (mit und ohne Zelle) auf die Stelle, auf der sich ein Vorgängertropfen befindet.
- 10 - Installation von Vermessungselementen, wie z.B. Elektroden, optische und andere Sensoren etc.
- 15 - Aufbringen von Identifikationsmarkierungen, wie z. B. Zahlen, Quadranten, Linien etc., zur Orientierung des Betrachters auf der Substratoberfläche.
- 20 - Unterstützungselemente zum definierten Abtrag von angefrorenem Material oder zum Aufbringen weiterer Schichten auf die tropfenbesetzte Oberfläche. Als Beispiel können Wälle zwischen den Mikrotropfenreihen angesehen werden, die die Tropfenhöhe über- oder unterschreiten und bis zu deren Höhe durch mechanisches oder anderes Abtragen, gefrorene Schichten entfernt bzw. aufgetragen werden können.
- 25 - Halterung der Objekte nach dem Auftauen in einer definierten Position (z.B. über elektrische Feldkäfige, die mittels Ultramikroelektroden erzeugt werden) oder Transport der Objekte zu festlegbaren Orten (in Mikrokanälen, mittels Pumpensystemen).
- 30 - Weiterverwendung des Substrats als komplexes Meß-, Dosierungs- oder Kultivierungssystem vor und nach dem Einfrieren bzw. Auftauen, sodaß es die Funktion eines Mikrolabors erfüllt. Das kann erreicht werden durch Integration gängiger Halbleiterchips (die Pumpen, Sensoren, aktive Bauelemente wie FET's und LED's enthalten) in die Substratoberfläche direkt oder als Hybridsystem oder auch unmittelbare Nutzung solcher Halbleiterchips.
- 35 - modifizieren, abbauen oder aufbauen von Oberflächenteilen der Mikrotropfen nach dem Einfrieren (z.B. durch Laser-Ablation oder Aufschießen weiterer Mikrotropfen).
- festlegen der hydrophob/hydrophilen Balance auf der Mikrometerskala (z.B. durch lokale Beschichtungen mit Tensiden, Amphoteren) oder Erzeugung von Gradienten oder Mustern auf der Oberfläche,

- Anpassung an optische, spektroskopische oder andere Meß- oder Auswerteeinheiten. (z.B. bezüglich räumlicher Auflösung, Absorptionseigenschaften),
- 5 - geometrische Standardisierung oder Automatisierung der quantitativen Auswerteverfahren und ihre effiziente technologische und ökonomische Herstellung (z.B. Herstellung gleicher Anordnungen durch Schablonen),
- 10 - Integration von Elementen, die auch im tiefgefrorenen Zustand eine Lokalisierung der mikroskopischen Objekte, Zellen und Mikrotropfen, sowie deren Vermessung erlauben. Denkbar sind fluoreszenzmarkierte Strukturen, die auch im Eis und in der Kühlflüssigkeit sichtbar gemacht werden können, oder Elektrodensysteme,
- 15 - Installation von Elementen, die ein Aufbringen weiterer Substrate (strukturiert oder unstrukturiert) oder Abdeckungen in der Art einer Sandwich-Bauweise auf die gefrorene Mikrotropfenstruktur gestatten.

Erfindungsgemäß ist es möglich, bei einer oder verschiedenen Kühltemperaturen an dem bereits mit Mikrotropfen und Zellen beauflagten Substrat Veränderungen vorzunehmen. So können 20 parallel zur Zelltropfenverschiebung über weitere Mikrotropfenschußsysteme Fluide auf dieselbe Stelle, übereinander oder nebeneinander gebracht werden. Das hat den Vorteil, daß die Lösungszusammensetzung, mit der die Zelle beim Einfrieren in Verbindung kommt, beim Auftauen durch eine ganz anders zusammengesetzte Lösung ersetzt wird. Eine entsprechende Asymmetrie der Lösungszusammensetzung ist mit anderen Kryokonservierungsverfahren für 25 Zellen in dieser Variabilität und räumlichen Dimension nicht möglich.

Die Kühlung des Substrats auf sehr niedrige Temperaturen (< - 100 bis - 273 °C) erlaubt zudem 30 die schnellsten Einfriergeschwindigkeiten, die bisher überhaupt erreicht werden können. Je nach Tropfengröße und deren Deformation beim Auftreffen auf die Substratoberfläche, sowie deren Strukturierung lassen sich Abkühlgeschwindigkeiten von wenigen bis zu mehreren Tausend Grad/Sekunde erzielen.

Ein besonderer Vorteil entsprechender Substrate ist deren Warm- und Kaltsterilisierbarkeit, ggf. 35 auch Reinigung mittels Ultraschall, die sterile und klinisch übliche Bedingungen garantieren.

Einen wesentlichen Aspekt der Erfindung stellt die Musterbildung der Mikrotropfenverteilung auf der Substratoberfläche und die daraus resultierenden Mikroobjektanordnungen dar. So können verschiedene Zellen in kleiner aber auch sehr großer Zahl in unmittelbarer Nachbarschaft

aufgefroren werden, deren Wechselwirkungen jedoch erst nach dem Auftauen beginnen können. Das Verfahren und die Vorrichtung sind deshalb geeignet, medizinisch-diagnostische als auch biotechnologisch-pharmazeutische Test- und Sensorchips vor ihrem Einsatz zu präparieren und über längere Zeiträume in unveränderter Lagefixierung und unter Beibehaltung der Vitalität der Zellen zu lagern und zu verschicken.

5

Mit den gängigen Mikrotropfenschußvorrichtungen, insbesondere nach dem piezoelektrischen Prinzip, lassen sich Schußfrequenzen bis in den kHz-Bereich erzeugen. Damit ist eine Automatisierung, Rechnersteuerung der Musterbildung und Zielanordnung, als auch das

10 Aufbringen großer Zellzahlen (einige Millionen Zellen pro Stunde) in kurzer Zeit mit hoher Präzision möglich. Es ist jedoch auch eine Ablenkung der Mikrotropfen mittels kurzzeitig ansteuerbarer Elektrodensysteme denkbar, wie sie z.B. schon beim Electropainting oder bei den bereits genannten Zellsortiergeräten eingesetzt werden.

15 Die freie Zugänglichkeit der Mikrotropfen auf der Oberfläche erlaubt es zudem, im eingefrorenen Zustand Materialien des Mikrotropfens oder der Zellen zu entfernen, auszutauschen oder aber stattdessen andere Materialien (z.B. genetisches Material, Enzyme, Membranmaterialien etc.) hinzuzufügen. Es kann sich dabei sowohl um sehr kleine Bereiche (Mikrometer, Nanometer), als auch um den ganzen Mikrotropfen oder das Substrat umfassende Flächen handeln. Auch hierbei

20 kann das Aufbringen des Materials über Mikrotropfenschußeinrichtungen erfolgen. Möglich sind weiterhin das Aufbringen aus einer Aerosol- oder Dampfphase, Sputtern in einer Gasatmosphäre oder Niederschlag im Vakuum von einem Target. Auch das Abtragen von gefrorenen Fluiden kann im Vakuum erfolgen. Dieser Prozess kann bis zur Gefriertrocknung und dem Gefrierätzen geführt werden.

25 Zwecks mechanischer Stabilität oder zum Erreichen bestimmter Oberflächeneigenschaften an Grenzflächen, können auf den Substraträger vor oder nach Einstellen der Temperatur  $T_1$  (mit oder ohne Mikrotropfen) ultradünne Filme auf vorliegende Oberflächenschichten aufgebracht werden, so daß sich nach dem Auftauen mischbare und/oder nichtmischbare oder sich

30 entmischende Flüssigkeitsbereiche herausbilden. Gemeint sind neben anderem z.B. der Wechsel von hydrophilen- und hydrophoben Flüssigkeiten, aber auch dünne Kontaktsschichten, die die Verbindung zwischen dickeren, aufgebrachten Objekten und dem Basistropfen herstellen.

35 Das Verfahren erlaubt es auch, mehrere Zellschichten übereinander oder durch Trennschichten zueinander isoliert aufzubringen. Es können auf einem Substrat beliebig viele verschiedene Medien nebeneinander auf kleinsten Flächen aufgebracht werden. Damit lassen sich Lösungszusammensetzungen in kleinsten Arrays testen, evtl. auch durch nachträgliches Aufbringen von Substanzen in verschiedener Konzentration (z.B. auf verschiedene

Formulierungen). Eine Anwendung dieser Testsysteme ist das Pharma- und Pflanzenschutzmittel- bzw. Schadstoffscreening.

Ein wesentlicher erforderlicher Teil des Verfahrens ist die Verlagerung einer Vielzahl von

5 Verfahrensschritten in den Tieftemperaturbereich, unter dem im folgenden der Temperaturbereich verstanden wird, der sich von der Gefriertemperatur der Umhüllungslösung bis nahe dem absoluten Nullpunkt der Temperatur erstreckt. Dieser Bereich erlaubt es, die in und um lebende Mikrosysteme üblicherweise flüssigen und semiflüssigen Materialien (Zytoplasma etc.) in den Zustand eines Festkörpers zu überführen. Erst dadurch werden Manipulationen an und in Zellen

10 möglich, die bei physiologischen Temperaturen unabdingbar zum Verlust der Vitalität führen würden oder aus Zeitgründen unmöglich sind. Die Überführung der Zellen in den Festkörperzustand ermöglicht es, lebende Systeme nahezu ohne zeitlichen Druck und unter Beibehaltung der Vitalität in wesentlichem Maße zu verändern und wird im folgenden unter dem Begriff "Tieftemperatur-Zytochirurgie" zusammengefaßt.

15 Bevorzugte Ausführungsbeispiele der Erfindung werden nachfolgend unter Bezugnahme auf die beiliegenden Figuren näher erläutert.

Figur 1 zeigt den schematischen Aufbau der Vorrichtung im Schnitt. Aus einer

20 Mikrotropfenschußvorrichtung (11) werden jeweils einzelne oder wenige Zellen mit einer Umhüllungslösung (12) in Mikrotropfen verschossen, die durch die Gasphase (14) mit hoher Geschwindigkeit gezielt auf die Substratoberfläche (13) auftreffen. Das Substrat (13) wird durch eine Kryoflüssigkeit (15), die sich in einem Gefäß (16) befindet, auf eine Temperatur  $T_1$  gebracht, die in der Regel weit unterhalb des Gefrierpunktes des Umgebungslösungsmittels liegt. Die

25 Substrat-Kühlanordnung wird so mit der Mikrotropfenschußvorrichtung (11) kalibriert, daß die Mikrotropfen beim Auftreffen auf die Substratoberfläche (13) anhaftend gefrieren, ohne daß die Mikrotropfen zerplatzen und wesentlich an Volumen verlieren. Je tiefer die Temperatur  $T_1$  gewählt wird, umso rascher erfolgt auch der Gefriervorgang der im Tropfen befindlichen Zelle. Dieser Prozess kann zusätzlich noch über die Mikrostrukturierung der Substratoberfläche beeinflußt

30 werden (z.B. Vergrößerung der Oberfläche).

Bei Tropfengrößen (Nährlösung) von etwa 50  $\mu\text{m}$  Durchmesser erfolgt eine Abkühlung auf ca. -100 °C bei einer Temperatur  $T_1 = -196$  °C im ms-Bereich und schneller. Damit lassen sich für die Kryokonservierung von Zellen nahezu alle Temperaturprogramme, die bisher angewendet werden, mittels der Variation der Substrattemperatur  $T_1$ , aber auch der Oberflächenstruktur und

35 Eigenschaften (T-Leitfähigkeit) verwirklichen.

Um die Mikrotropfen und damit auch die zu konservierenden Zellen in arrayartigen Anordnungen aufzubringen, wird entweder das Substrat (13) oder/und die Mikrotropfenschußvorrichtung (11) zueinander verschoben oder aber werden die Mikrotropfen während des Fluges durch die Gasphase abgelenkt.

5

Nach dem Aufbringen der Mikrotropfen wird das Substrat (13) auf eine Temperatur  $T_3$  gebracht, bei der es weiter bearbeitet, z.B. mittels einer mechanischen Bearbeitungsmittels (17), oder Temperatur  $T_2$  gelagert werden soll. In der Regel ist das die Temperatur der Kryobanken, wie sie üblicherweise für die Zelllagerung Anwendung findet (-80 bis -273°C).

10

Beim Auftauen kann wiederum die skizzierte Vorrichtung in der folgenden Modifizierung verwendet werden: Statt des Kühlmittels(15) wird das Substrat (13) entweder durch eine direkt anhaftende Vorrichtung (Thermistor oder anderes lokales Heizelement) oder über eine warme Flüssigkeit auf eine Temperatur  $T_1$  gebracht, die in der Regel oberhalb des Gefrierpunktes der 15 Umhüllungslösung liegt. Der Prozeß der Erwärmung kann durch Aufschießen von warmen Mikrotropfen aus der Mikrotropfenschußvorrichtung (11) unterstützt werden (z.B. Nährlösung). In Frage kommen jedoch auch andere Erwärmungsarten, bis hin zu Mikrowellen, Infrarot(laser)strahlung, oder induktives Heizen des Substrates. Auch dieser Prozeß kann in gut steuerbaren Etappen, und falls erforderlich, in sehr kurzer Zeit absolviert werden.

20

Die folgenden Figuren 2 bis 16 zeigen mikroskopische Ausschnitte der Substratoberfläche in Schnittansichten. Die Abmessungen der dargestellten Strukturen betragen einige Mikrometer bis zu einigen Millimetern, vorzugsweise einige 10 Mikrometer. Sie können aber auch im Submikrometerbereich liegen, z.B. für die Anwendung bei Makromolekülen.

25

Figur 2, Figur 3 und Figur 4 sind Darstellungen möglicher Anordnungen von Mikrotropfen (22,31,44) auf der Substratoberfläche (23,32,41). Figur 2 zeigt ein quadratisches Array mit jeweils zueinander getrennt aufgebrachten Mikrotropfen ( $7 \times 7 = 49$ ) (22) in denen sich jeweils eine Zelle (21) befindet. Figur 3 zeigt ein Array von 8 Viereraggregaten sich berührender Mikrotropfen (31) mit jeweils einer Zelle. Figur 4 zeigt zwei Viereraggregate und einen Einzeltropfen (44) zwischen Strukturelementen (42,43), die der Vermessung oder mechanischen Abgrenzung dienen. Die mit (43) bezeichneten Elemente können z.B. Elektroden sein, die auch im tiefgefrorenen Zustand Meßsignale liefern. Die mit (42) bezeichneten Elemente können z.B. Temperaturfühler sein. Die Größe der dargestellten Elemente liegen im Submikro- und Mikrometerbereich.

35

Figur 5 zeigt ein Substrat (53) ohne Oberflächenstrukturierung im Schnitt. Es kann sich dabei um einen Glas-, Plastik-, Keramik-, Halbleiter- oder Metallträger handeln. Die aufgeschossenen Mikrotropfen (51) enthalten jeweils eine Zelle, eine Zellorganelle oder ein Zellaggregat (52). Je

nach gewählter Temperatur  $T_1$  wird der Mikrotropfen von seiner ursprünglichen Form abweichend gefrieren. Erfahrungsgemäß kann nach Positionierung der Mikrotropfen ein Vakuumbearbeitungsschritt durchgeführt werden, bei dem die Substratoberfläche mit den Tropfen einem Unterdruck ausgesetzt wird, der so ausgewählt ist, daß das Umhüllungslösungsmittel je 5 nach der Temperatur  $T_1$  schrittweise abdampfen oder sublimieren kann.

Figur 6 zeigt ein Substrat (63) im Schnitt mit Mikrostrukturierungen (etwa tropfengroße Vertiefungen (61)), in die jeweils ein Mikrotropfen (62) aufgeschossen worden ist.

10 Figur 7 zeigt eine Anordnung, wie sie in Figur 6 beschrieben ist (Substrat (73), Mikrotropfen mit Zelle (72)). Im Unterschied zu oben ist hier ein zweiter Mikrotropfen (71) auf jeden Mikrotropfen aufgeschossen worden. Dieser Tropfen (71) kann eine Zelle enthalten, bzw. auch aus einem anderen Lösungsmittel bestehen. Je nach Tiefe der Strukturierung oder Wahl der Temperatur  $T_1$  können zwei oder mehrere Mikrotropfen übereinander plaziert werden. Es lassen sich 15 Tropfensäulen von bis zu 50 Tropfen erzeugen, die in gefrorenem Zustand mechanisch stabil bleiben.

Figur 8 zeigt einen Schnitt durch eine stark strukturierte Oberfläche (85), in deren Vertiefungen sich Mikrotropfen mit Zellen (83) zwischen Elektroden (84) befinden. Auf den Stegen (81) sind ebenfalls Mikrotropfen mit gleichartigen oder unterschiedlichen Zellen (82), z.B. in einer anderen 20 Lösung aufgebracht. Diese Anordnung entspricht schon in ihren Grundzügen einem vorbereiteten Testchip, wie er für das Pharma- oder Schadstoff-Screening verwendet werden kann. Erst nach dem Auftauen und dem Aufbringen eines die gesamte Oberfläche benetzenden Lösungsmittels treten die beiden Zellarten in Kontakt bzw. werden aktiviert. Die Zell-Zell-Wechselwirkungen 25 werden über die Mikroelemente (84) detektiert.

Figur 9 zeigt den Schnitt durch ein Substrat (93) mit Vertiefungen, die durch Wälle definierter Höhe (94) begrenzt werden. Die Wälle sind so flach, daß die Mikrotropfen (91) über die Oberflächenebene (Strichellinie) des Substrates (93) mit einem Teil (92) herausragen. Letzterer 30 kann z.B. mittels mikromechanischer Vorrichtungen (ähnlich einem Mikrotom) im tiefgefrorenen Zustand abgetrennt, abgefräst, abgeschnitten oder aber auch mit Hilfe eines Laserstrahles ablatiert oder abgesprengt werden. Dabei kann es durchaus erwünscht sein, auch Teile des Zellinneren freizulegen, Material aufzubringen (z.B. genetisches), Material abzutragen (z.B. den Zellkern) und/oder durch weiters Aufbringen, z.B. von Lipiden, Polymeren u.ä. die 35 Voraussetzungen zu schaffen, die Zellen während und nach dem Auftauen wieder zu verschließen, ggf. auch unter Beibehaltung der Vitalität der Zellen. Dieses Verfahren ist neben anderem als Ausgangspunkt für eine Tieftemperatur-Zytochirurgie zu betrachten.

Figur 10 zeigt den Schnitt durch ein Substrat (103) mit Vertiefungen, in denen sich jeweils ein Mikrotropfen (101) mit Zelle (102) befindet. Das System ist mit einer Schicht (104) überdeckt. Das können sehr dünne Filme (molekulare Abmessungen) sein, die der mechanischen Stabilisierung, der Beeinflussung der Lösungszusammensetzung beim Auftauen, als Verdunstungsschutz oder aber der Herausbildung einer Grenzfläche (hydrophil/hydrophob) dienen. Es kann jedoch auch ein Material sein, mit dessen Hilfe nach dem Auftauen die Zellen an einem dünnen Film (104) haftend entnommen werden können. Des Weiteren sind Schichten im Mikrometerbereich denkbar.

Figur 11 zeigt den Schnitt durch ein Substrat (113), bei dem schichtförmig Mikrotropfen (111) mit jeweils einer Zelle (112) aufgebracht und mit Schichten (111, 115, 116) bedeckt werden. Es kann sich hierbei um gleichartige oder unterschiedliche Schichten, Mikrotropfen oder Zellen handeln. Dieses Verfahren dient z.B. dem nachträglichen Aufbringen von Kryoprotektanten für den Auftauprozess. Da diese Substanzen häufig zellschädigende Wirkungen entfalten und erst beim Auftauen benötigt werden, kann im tiefgefrorenen Zustand noch keine Wechselwirkung mit der Zelle auftreten. Auf diese Weise lassen sich höhere Überlebensraten der Zellen erreichen.

Figur 12 zeigt den Schnitt durch ein Substrat (123) mit einer Vertiefung, in die ein Mikrotropfen mit Zelle (122) aufgebracht wurde, nach dem Auftauen. Die Zelle (122) wird über die Elektroden (124), die über eine Isolierschicht (125) zueinander elektrisch isoliert sind, in einem Feldkäfig in freier Lösung (121) levitieren und ggf. vermessen. Mit ähnlichen Mikroelementen lassen sich die Zellen nach dem Auftauen auf dem Substrat bewegen oder in definierter Position halten.

Figur 13a zeigt in vergrößerter Schnittdarstellung eine Grube in einem Substrat (131), in der sich ein Mikrotropfen (133, 134) befindet, in dem eine Zelle (132) in tiefgefrorenem Zustand kryokonserviert ist. Bei einer geeigneten Temperatur unterhalb des Gefrierpunktes der Umhüllungslösung und evtl. der Zelle kann mit einem mechanischen oder anders gearteten Mikroschneidegerät (planer Schleifkörper) die Tropfenkappe und ein Teil der Zelle (134, 135) abgehoben werden. Die Höhe des Schnittes wird durch die Tiefe der Grube bestimmt. Die Größenordnung der Schnittfläche, zum Beispiel einer biologischen Zelle, kann typischerweise einige  $\mu\text{m}^2$  betragen. Es sind jedoch auch kleinere Öffnungen oder Öffnungen im Bereich 10 bis 100  $\mu\text{m}^2$  denkbar. Im einfachsten Fall wird die entfernte Tropfenkappe verworfen und eine oder mehrere dünne Schichten auf die Schnittoberfläche aufgebracht, wie es in Figur 13b dargestellt ist. Die Oberfläche der Zelle wird etwas über die Begrenzung derselben, mit einer Lösung (136) bedeckt, die z.B. lipophile Eigenschaften aufweisen kann oder einer Lipidbi- oder multilayer entspricht. Es ist ebenfalls möglich, dünne Filme entsprechender Substanzen dicht schließend, lokal oder breitflächig aufzubringen. Zur weiteren Stabilisierung der Schichtenfolge beim Auftauen können weitere Schichten (137), z.B. auch in hydrophiler-hydrophober Folge, aufgebracht werden. Das Aufbringen der Schichten und Lösungen kann mittels der bereits beschriebenen

Mikrotropfenschußvorrichtungen erfolgen, aber auch durch Aufnebeln, Niederschlag aus der Gasphase etc. bewerkstelligt werden. Auf diese Weise ist eine angemessene Dosierung und partielle Bedeckung gewährleistet. Beim Auftauen tritt über die Wechselwirkung bzw. Durchdringung der Schichten als auch die gestaffelten Auftautemperaturen eine Stabilisierung der 5 Grenzflächen ein, so daß die vorher mechanisch geöffneten Zellen, unter Beibehaltung ihrer Vitalität verschlossen werden.

In Figur 13c ist neben den in Figur 13b genannten Schichten (136,137) zuvor ein Mikrotropfen (138) auf die geöffnete Zelloberfläche oder in deren Nähe gebracht worden, der eine Substanz 10 enthält, die in den Zellmetabolismus gelangen soll. Das können genetisches Material, Makromoleküle, Markierungssubstanzen, Isotope aber auch künstliche Körper sein.

Figur 13d zeigt das Aufbringen eines Lösungstropfens (138), wie er in Figur 13c beschrieben ist. Danach wird die gesamte Oberfläche des Substrates mit einer Lösung (136) bedeckt, die auffriert 15 und beim Auftauen die geordnete Verbindung zu der danach aufgesetzten Zellkappe (135) und den ursprünglichen Teil des Mikrotropfens (134) herstellt. Alle Schritte erfolgen im gefrorenen Zustand, wobei in der Regel Temperaturen unter -80°C zweckmäßig sind, da hier kein migratorisches Wachstum von Eiskristallen mehr erfolgt.

20 In Figur 14a ist das Abheben eines größeren Teiles (144) eines aufgefrorenen Mikrotropfens(143) und der darin befindlichen Zelle (142, 145) gezeigt. Die Schnitthöhe wird durch die Höhe des Walles (141) festgelegt, auch die Zellwand und Membran (146) wird mikroskopisch fein durchschnitten. Im Unterschied zu Figur 13 wird hier jedoch der abgehobene Teil (144,145,146) 25 nicht verworfen, sondern zum Aufsetzen auf einen anderen, ähnlich behandelten Mikrotropfen weiter verwendet. Das Resultat einer solchen Manipulation aus zwei Zellteilen (142,147) und Tropfenteilen (143,148) ist in Figur 14b im Schnitt gezeigt. Zum besseren Verschmelzen beider Teile kann es erforderlich werden, weitere Schichten an der Verbindungsfläche beider 30 Mikrotropfen vor dem Aufsetzen aufzubringen, die das Verschließen evtl. verbleibender Öffnungen bewerkstelligen (hier nicht dargestellt). Die elliptischen Kreise in den Zellen, veranschaulichen Zellorganellen.

Figur 14c und d veranschaulichen zwei weitere Manipulationsarten von zellbiologischer und 35 medizinischer Relevanz. Einmal die Entfernung eines Mikrovolumens (149a) aus dem Zellmaterial und das Einfügen einer Organelle, eines künstlichen Körpers oder eines anderen Zellkompartiments (149b). Zum anderen die Entfernung eines Zellkompartiments (hier dargestellt als Entfernung des Zellkernes (149c)) und Ersatz des entfernten Volumens durch eine fremde Substanz (149d), die in der Regel physiologisch verträglich sein sollte oder auch anderen zellulären Ursprungs sein kann. Es kann sich dabei aber auch um einen Festkörper, oder ein

Gasraum handeln, der vom Zellinnenraum nach dem Auftauen toleriert wird. Anwendungsgebiete dieser Manipulationsverfahren sind die Genetik, Molekularbiologie, Biotechnologie und Medizin.

5 **Figur 15a** veranschaulicht das Öffnen einer Zelle, wie bereits beschrieben, die Entnahme eines Teiles des Zellmaterials und das Einfügen anderen Materials (157) und einer kompletten Zelle (156), z.B. einer Bakterienzelle, einzelligen Alge. Mit (158) sind die Zellorganellen, mit (152) der Zellkörper, mit (153) der Tropfenteil auf dem Substrat, mit (151) der Wall des Substrates und mit (155) der abgetrennte Zellteil, mit (154) der abgetrennte Tropfenteil bezeichnet.

10 15 **Figur 15b** ist veranschaulicht, daß die Verletzungs- und Berührungsfläche zwischen zwei auf diese Weise aufeinander gesetzten Tropfen- (153, 159) und Zellteilen (152a, 152b) sehr kleinflächig sein kann (Mikrometer- oder sogar Submikrometerbereich). Ziel dieser Manipulation ist die Bildung eines Zellpaars, eines Zellfusionates (nach dem Auftauen), oder einer temporären oder dauerhaften Zellverbindung. Anwendungen liegen vor allem in der Hybridomatechnik.

15 **Figur 16a** zeigt das Resultat der folgenden Verfahrensschritte im Schnittbild: Tropfenmaterial (162) wird auf die bereits beschriebene Weise oberhalb des Substrates (161) entfernt, allerdings so, daß die Zelloberfläche freigelegt aber nicht verletzt wird. Auf die freigelegte Fläche der Zelle (163) werden lokal feinst dosiert Materialien (165) aufgebracht, z.B. durch gezielten Mikrotropfenbeschuß und augenblickliches Auffrieren. Diese Materialien können genetische Moleküle, Bindungsproteine, Enzyme, Markermoleküle, Salze etc. enthalten, die während oder nach dem Auftauen an der Oberfläche ankommen, anhaften oder in die Zelle oder die wandnahen Bereiche eindringen sollen. Zur Stabilisierung und Unterstützung der Auftaprozesse kann es erforderlich sein, weitere Schichten (hier mit (164) bezeichnet), auch in größerer Dicke, aufzubringen. Auch mit diesen Verfahrensschritten ist eine medizinische, biotechnologische oder umweltsensorische Anwendung angestrebt. So kann sich die Zelle in einem Sensorchip befinden und die Testung des Einflusses von Umweltnoxen nach dem Auftauen verfolgt werden, in dem Zellparameter gemessen werden. In diesem Zusammenhang ist nochmals zu erwähnen, daß die genannten Prozesse auch durch Hohlräume unterstützt werden können, die durch Brückenbildung über dem Tropfenmaterial oder der Zelle erzeugt werden.

20 25 **Figur 16b** veranschaulicht einen weiteren Verfahrensschritt zur Bearbeitung eines Mikrotropfens (162) und der darin befindlichen tiefgefrorenen Zelle (163). Genutzt wird der Umstand, daß ein auf das tiefgefrorene Tropfen- oder Zellmaterial aufgeschossener Flüssigkeitstropfen (166) nicht gefriert, ohne einen Teil des gefrorenen Materials (163, 162), auf das er trifft, kurzzeitig zu verflüssigen. Wie groß dieser Materialbereich (167) wird, hängt von der Substrattemperatur aber auch von der Tropfentemperatur und den Volumina beider Mikrotropfen ab. Bei sehr tiefen Temperaturen des Substrates und Temperierung des Mikrotropfens (166) nahe dem Gefrierpunkt,

liegt der Auftaubereich (167) in molekularer Dimension, bei Substrattemperaturen etwas unterhalb des Gefrierpunktes und hohen Mikrotropfentemperaturen, bei wässrigen Lösungen bis zu 100 °C, sind es mikroskopische Dimensionen, bis hin zur Substratoberfläche. Beides wird genutzt, um in definierter Weise Mischphasen, molekulare und mikroskopische Umstrukturierungen oder

- 5 Anheftprozesse auf der Substratoberfläche zu bewerkstelligen.

Die hier am Beispiel biologischer Objekte erläuterten Verfahrensschritte und Vorrichtungen können ebenfalls auf dem Gebiet der mikrotopografisch, multikompartimentierten Reaktionschemie angewendet werden.

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Kryokonservieren und zur Tieftemperaturbehandlung von mikroskopischen Objekten, insbesondere biologischen Objekten, von Zellverbänden, einzelnen Zellen oder Zellbestandteilen, auf Substratoberflächen, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
  - Einbringung der Objekte in mindestens ein Vorratsreservoir mit einem Umhüllungslösungsmittel,
  - zeitlich und räumlich gesteuerte Führung der umhüllten Objekte von dem mindestens einen Vorratsreservoir auf ein die Substratoberfläche bildendes, temperierbares Substrat-Target der Temperatur  $T_1$  mittels mindestens einer Mikrotropfenplazierungseinrichtung,
  - lagefixiertes Anhaften der Objekte auf dem Substrat-Target,
  - Einstellung der Targettemperatur auf die Konservierungstemperatur  $T_2$  oder Bearbeitungstemperatur  $T_3$ , und
  - Lagerung oder/und Bearbeitung des beschickten Substrat-Targets.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Führung der Objekte mit einer Mikrotropfenschußeinrichtung erfolgt und durch eine jeweils von Schuß zu Schuß geänderte Ausrichtung der Mikrotropfenbewegung in Bezug auf das Target und / oder Bewegung des Targets in Bezug auf die Mikrotropfenschußeinrichtung derart gesteuert wird, daß die Objekte in definierten Abständen oder in Mustern auf der Oberfläche anhaften.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß mit mehreren Mikrotropfenschußeinrichtungen gleichzeitig oder nacheinander Objekte auf eine oder mehrere Targetstellen geschossen werden.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur  $T_1$  oberhalb dem Gefrierpunkt von Wasser und die Temperaturen  $T_2$ , und  $T_3$  im Bereich von -2°C bis -273°C liegen.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche des Substrat-Targets vor der Beschickung mittels einer Mikrotropfenschußeinrichtung partiell oder vollständig mit einem Gel, einer molekularen Schicht, einer Flüssigkeit oder einem Polymer oder aber einer Vielzahl oder Kombination aus diesen überzogen wird.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperaturen  $T_1$ ,  $T_2$  und  $T_3$  im Bereich von -5°C bis -273°C liegen.

7. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Objekte und Mikrotropfen während des Fluges auf die Oberfläche des Substrat-Targets optisch oder elektrisch vermessen werden, wobei die Auftreffposition des Mikrotropfens mit den Objekten in Abhängigkeit von den bei der Vermessung erhaltenen Daten variiert werden kann.

5

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Lagerung und/oder Bearbeitung des beschickten Substrat-Targets in flüssigem Stickstoff oder ähnlichen Kryoflüssigkeiten oder deren Gasphasen erfolgt.

10 9. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das gesamte Verfahren oder auch einzelne Arbeitsabschnitte bei vom Normaldruck abweichenden Drucken erfolgen.

15 10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das beschickte Substrat-Target vor der Lagerung und/oder Bearbeitung mit weiteren dünnen Schichten überzogen wird, wobei die dünnen Schichten beispielsweise durch gefrorene Lösungen gebildet werden, die mit einer Mikrotropfenschußeinrichtung, aufgebracht werden, oder die dünnen Schichten, die auch metallisch sein können, beispielsweise durch Vernebeln, Aufsputtern in einer Gasphase oder Niederschlag im Vakuum erzeugt werden.

20 11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß beim Bearbeitungsschritt im tiefgefrorenen Zustand Material entfernt und/oder Zellmaterial abgehoben wird, was mechanisch, durch optische Ablation, dem Gefrierätzen ähnliche Verfahren oder Abdampfen im Vakuum erfolgt.

25 12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß im tiefgefrorenen Zustand Material aufgebracht und/oder ausgetauscht wird, das auch synthetischen, genetischen oder zellulären Ursprungs ist, oder Material aufgebracht wird, das beim oder nach einem Auftauen zu einem Verschließen der geöffneten Zellen unter Erhalt ihrer Vitalität führt.

30 13. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Objekte im aufgebrachten Zustand gefriergetrocknet werden.

14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Mikrotropfen mit oder ohne Zellen, gleicher oder verschiedener Zusammensetzung übereinander plaziert und angefroren oder nebeneinander aufgebracht werden.

15. **Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine auf die Substratoberfläche aufgebrachte Schicht die Mikrotropfen mit den Zellen oder Teile davon lagefixiert durch Abziehen abhebt.**

5 16. **Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen vor dem Einfrieren und/oder nach dem Auftauen durch Erwärmung des Targets bis zu einer Temperatur oberhalb des Gefrierpunktes der Umhüllungslösung über elektrische Feldkräfte manipuliert oder schwebend in der Umgebungslösung gehalten werden.**

10 17. **Vorrichtung zum Kryokonservieren und Tieftemperaturbearbeiten von mikroskopischen Objekten, insbesondere biologischen Objekten, von Zellverbänden, einzelnen Zellen oder Zellbestandteilen, auf Substratoberflächen, gekennzeichnet durch eine Mikrotropfenschübeinrichtung zum zeitlich und räumlich gesteuerten Aufschießen von Umhüllungslösungstropfen mit den von diesen umhüllten biologischen Objekten auf ein temperierbares Substrat-Target, das die Substratoberfläche bildet.**

15 18. **Vorrichtung gemäß Anspruch 17, gekennzeichnet dadurch, daß die Vorrichtung Bearbeitungsmittel zum Lagern und/oder Manipulieren der aufgebrachten Objekte enthält.**

20 19. **Vorrichtung gemäß Anspruch 17 oder 18, gekennzeichnet dadurch, daß das Substrat-Target eine Oberflächenstruktur besitzt, die insbesondere Mikroelektroden, elektronische Sensor- oder Bauelemente, Vertiefungen, Erhebungen, Durchbrüche oder Känele oder feine Strukturen, wie Riffeln, Säulen, Spitzen, Wälle, die die Oberfläche vergrößern mit typischen Abmessungen im Mikrometer- oder Submikrometer-Bereich enthält.**

25 20. **Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 19, gekennzeichnet dadurch, daß die Mikrotropfenschübeinrichtung oder/und das Substrat-Target aus einem Halbleitermaterial bestehen, insbesondere siliziumbasiert sind.**

30 21. **Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat-Target beim Aufschießen eine Temperatur  $T_1$  über dem Gefrierpunkt des Wassers besitzt und nach dem Aufschießen auf eine Konservierungstemperatur  $T_2$  im Bereich von  $-5^{\circ}\text{C}$  bis  $-273^{\circ}\text{C}$  abkühlbar und temperierbar ist, wobei das Substrat-Target nach zeitlich festgelegten Temperaturprogrammen abgekühlt oder/und erwärmt werden kann und zum Beispiel durch ein**

35 **Kühlmittel-Bad, das insbesondere flüssigen Stickstoff enthält, oder die Gasatmosphäre des Kühlmittel-Bades kühlbar ist.**

22. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß das Bearbeitungsmittel eine Mikrotomschneide, eine Mikrobohr- und Fräsmaschine, einen Laserstrahl oder ein anderes Element enthält, mit dem mechanisch, thermisch oder optisch Material im tiefgefrorenen Zustand der Mikrotropfen oder Zellen entfernt oder abgehoben wird.

5

23. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Substrattemperatur und die Tropfentemperatur unabhängig voneinander eingestellt werden können und für den zu schießenden Mikrotropfen auch weit oberhalb des Gefrierpunktes der Tropfenlösung liegen kann.

10

24. Verwendung des Verfahrens oder der Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 23 zur Kryokonservierung von Zellen für eine medizinische, biologische, pharmazeutische oder anderweitig nutzbare Zellbank oder zur Herstellung von Substraten als Testchip, Sensor, Screening-Element in der medizinischen Diagnostik, Umwelttechnik und pharmazeutischen

15 Forschung.

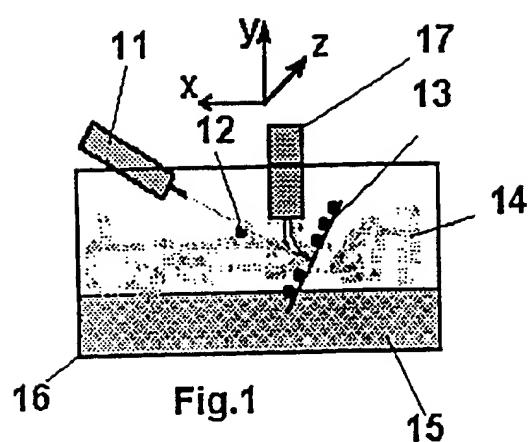


Fig.1

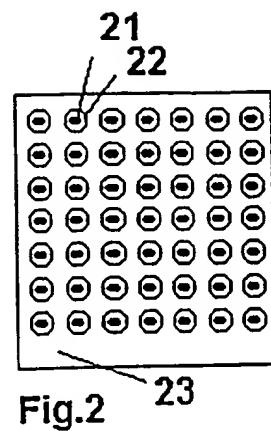


Fig.2

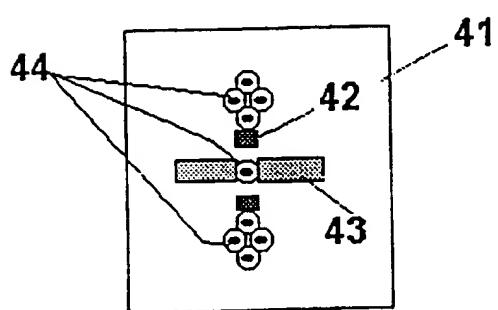


Fig.4

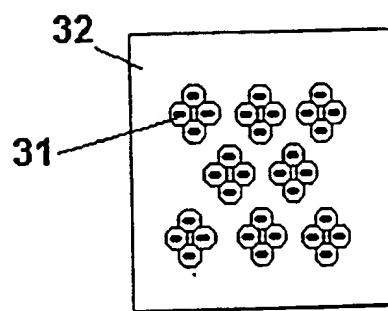


Fig.3

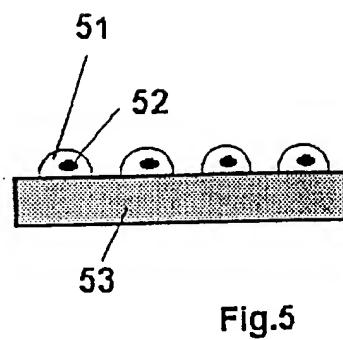


Fig.5

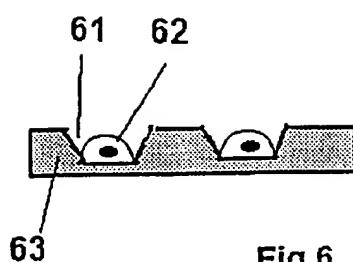


Fig.6

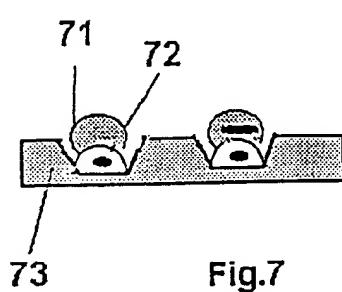


Fig.7

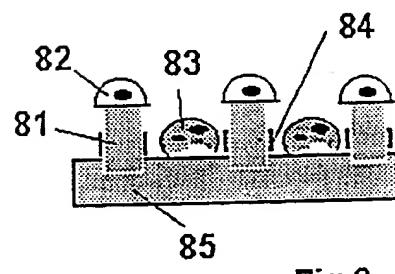


Fig.8

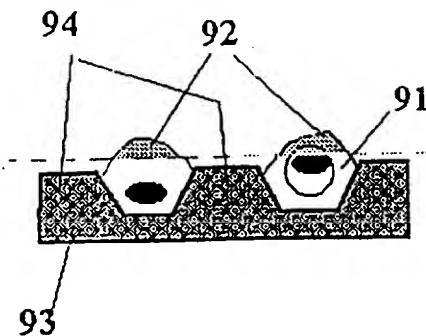


Fig.9

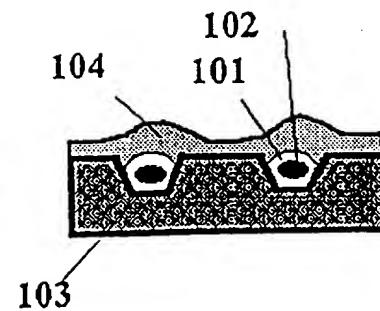


Fig.10

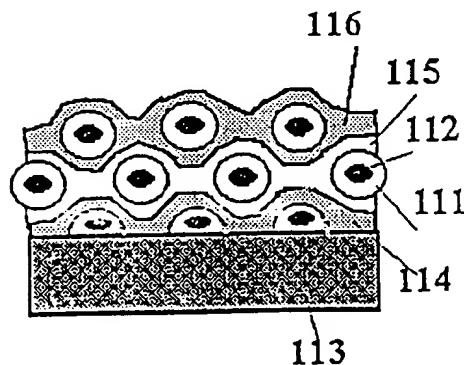


Fig.11

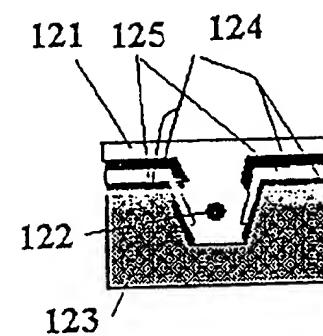


Fig.12

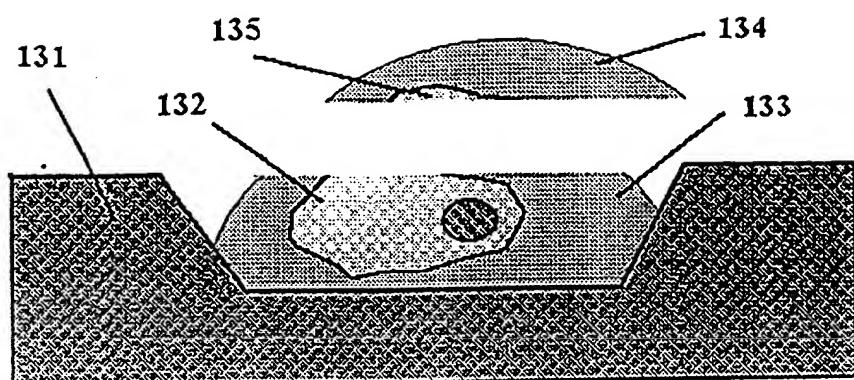


Fig.13a

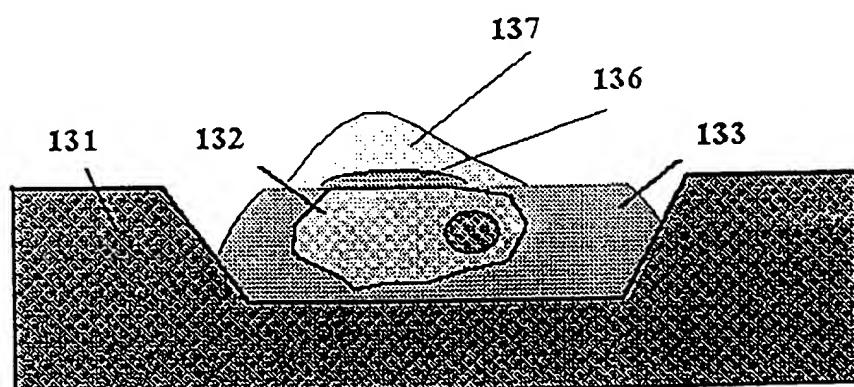


Fig.13b

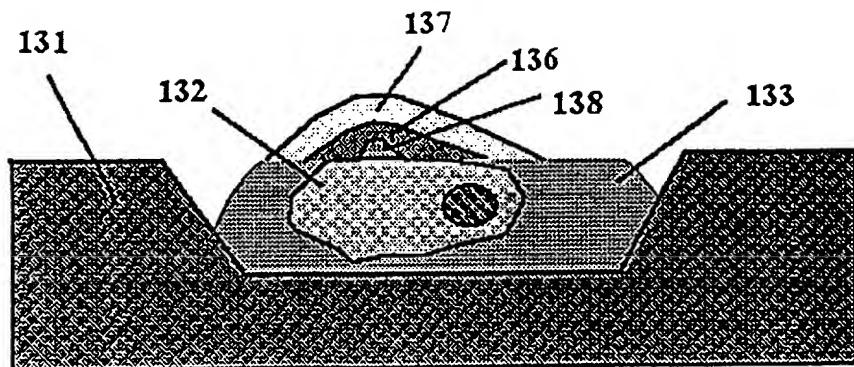


Fig.13c

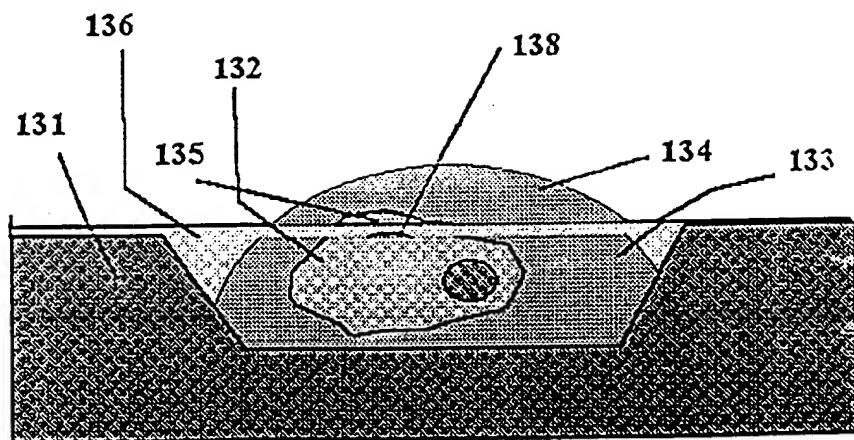


Fig.13d

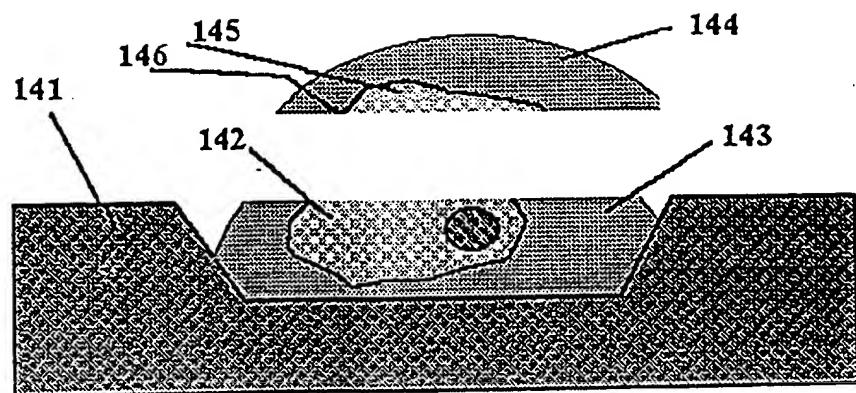


Fig.14a

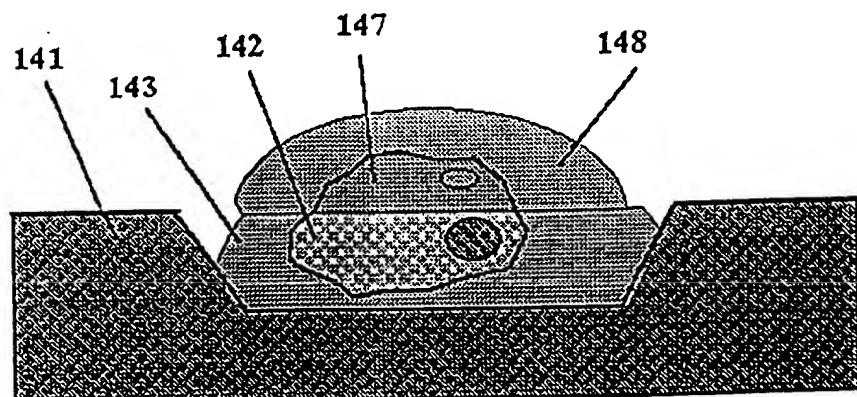


Fig.14b

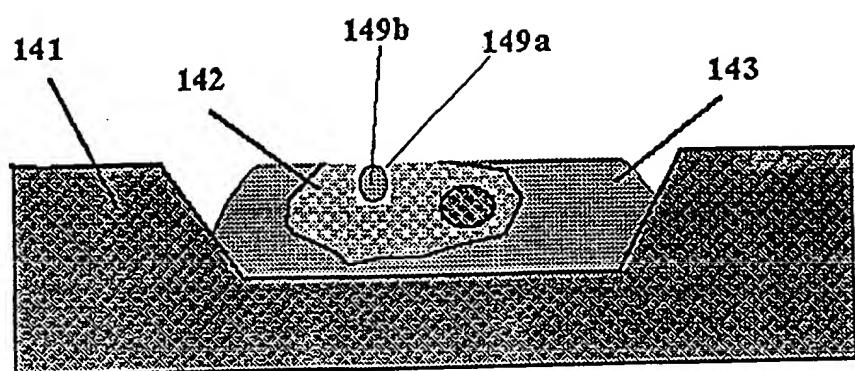


Fig. 14c

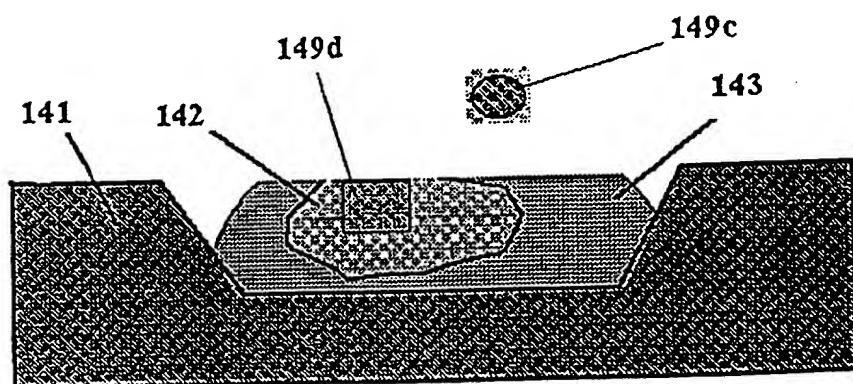


Fig. 14d

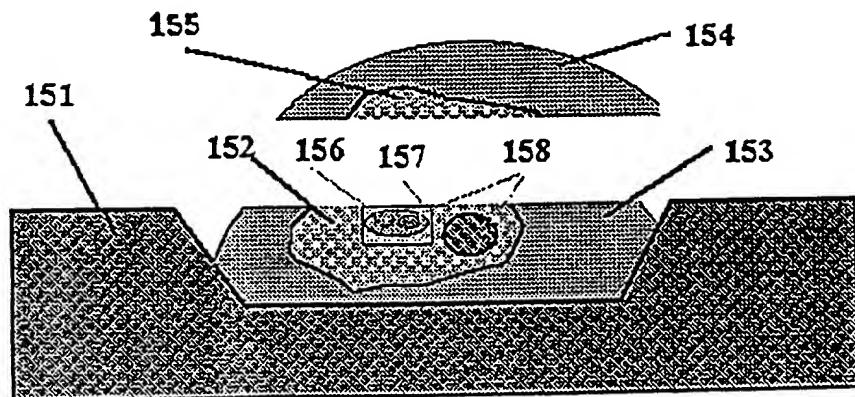


Fig. 15a

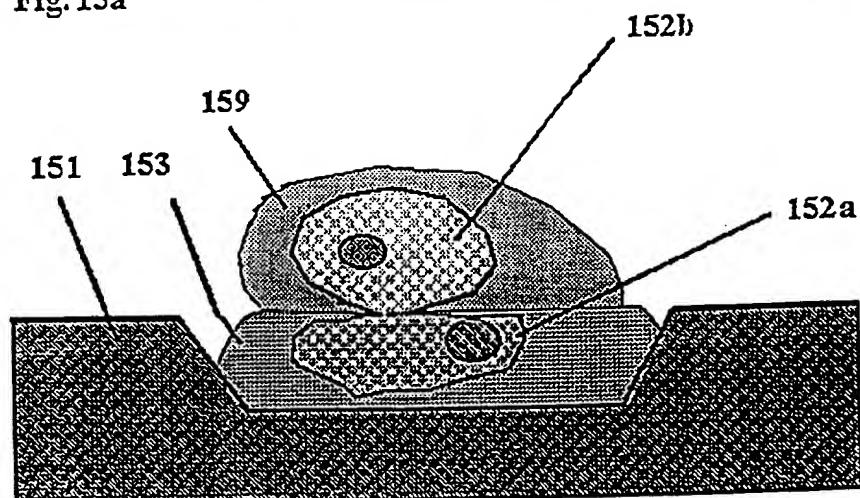


Fig. 15b

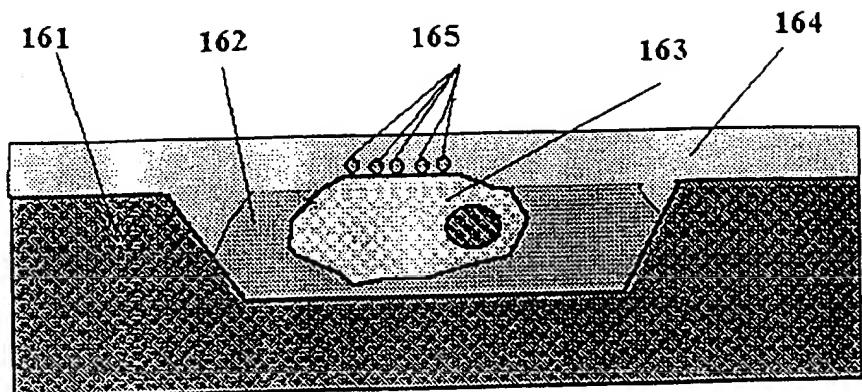


Fig. 16a

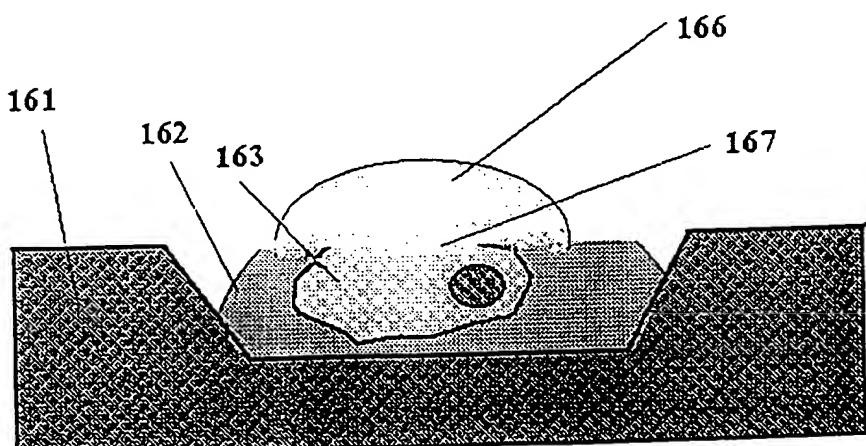


Fig. 16b

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 95/01490

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 A01N1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO,A,93 22598 (ABAY SA) 11 November 1993 see the whole document ---	1-24
X	WO,A,93 03493 (DOW CHEMICAL CO) 18 February 1993 see page 7, line 9 - page 11, line 27	17-23
Y	---	1-16,24
Y	WO,A,82 02562 (WEAVER JAMES C) 5 August 1982 see page 2, line 30 - page 9, line 23	1-24
Y	---	1-24
Y	EP,A,0 475 409 (LIFECELL CORP) 18 March 1992 see page 2, line 1 - line 5 see page 4, line 54 - page 6, line 7 ---	1-24
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*'E' earlier document but published on or after the international filing date
- \*'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*'&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

29 February 1996

Date of mailing of the international search report

12.03.96

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Lamers, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 95/01490

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,4 531 373 (RUBINSKY BORIS) 30 July 1985 see the whole document ---	1-24
A	US,A,4 142 656 (SMITH MICHAEL R ET AL) 6 March 1979 see column 2, line 60 - column 3, line 36 -----	1-24

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No  
PL/DE 95/01490

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9322598	11-11-93	US-A-	5275016	04-01-94
		AU-B-	3968493	29-11-93
		CA-A-	2134224	11-11-93
		EP-A-	0637367	08-02-95
		JP-T-	7507940	07-09-95
WO-A-9303493	18-02-93	NONE		
WO-A-8202562	05-08-82	US-A-	4399219	16-08-83
		EP-A,B	0070318	26-01-83
EP-A-0475409	18-03-92	AU-B-	6740594	22-09-94
		AU-B-	650045	09-06-94
		AU-B-	8379791	19-03-92
		CA-A-	2051092	13-03-92
		JP-A-	5126696	21-05-93
		US-A-	5336616	09-08-94
		US-A-	5364756	15-11-94
US-A-4531373	30-07-85	NONE		
US-A-4142656	06-03-79	NONE		

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PC./DE 95/01490

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 A01N/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 A01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO,A,93 22598 (ABAY SA) 11.November 1993 siehe das ganze Dokument ---	1-24
X	WO,A,93 03493 (DOW CHEMICAL CO) 18.Februar 1993 siehe Seite 7, Zeile 9 - Seite 11, Zeile 27 ---	17-23
Y	WO,A,82 02562 (WEAVER JAMES C) 5.August 1982 siehe Seite 2, Zeile 30 - Seite 9, Zeile 23 ---	1-16,24
Y	EP,A,0 475 409 (LIFECCELL CORP) 18.März 1992 siehe Seite 2, Zeile 1 - Zeile 5 siehe Seite 4, Zeile 54 - Seite 6, Zeile 7 ---	1-24
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfunderner Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfunderner Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
29.Februar 1996	12.03.96
Name und Postanschrift der internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Lamers, W

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 95/01490

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US,A,4 531 373 (RUBINSKY BORIS) 30.Juli 1985 siehe das ganze Dokument ---	1-24
A	US,A,4 142 656 (SMITH MICHAEL R ET AL) 6.März 1979 siehe Spalte 2, Zeile 60 - Spalte 3, Zeile 36 -----	1-24

1

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 95/01490

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9322598	11-11-93	US-A-	5275016	04-01-94
		AU-B-	3968493	29-11-93
		CA-A-	2134224	11-11-93
		EP-A-	0637367	08-02-95
		JP-T-	7507940	07-09-95
WO-A-9303493	18-02-93	KEINE		
WO-A-8202562	05-08-82	US-A-	4399219	16-08-83
		EP-A,B	0070318	26-01-83
EP-A-0475409	18-03-92	AU-B-	6740594	22-09-94
		AU-B-	650045	09-06-94
		AU-B-	8379791	19-03-92
		CA-A-	2051092	13-03-92
		JP-A-	5126696	21-05-93
		US-A-	5336616	09-08-94
		US-A-	5364756	15-11-94
US-A-4531373	30-07-85	KEINE		
US-A-4142656	06-03-79	KEINE		